梨小食心虫 Minus-C 气味结合蛋白的分子克隆、表达谱及结合特性分析

陈秀琳[1,2,#], 苏 丽[3,#], 陈丽慧[1], 李怡萍[1], 仵均祥[1,*], 李广伟[2,*]

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100; 2. 延安大学生命科学学院, 陕西延安 716000; 3. 广西大学农学院植物保护系, 南宁 530005)

摘要:【目的】通过克隆梨小食心虫 *Grapholita molesta* 的 Minus-C 气味结合蛋白(odorant binding protein, OBP)基因,并测定其在成虫不同组织中的表达量及其重组蛋白对气味配体的结合能力,推测其嗅觉生理功能。【方法】基于梨小食心虫雌虫触角转录组测序数据,利用 RT-PCR 克隆 Minus-C OBP 基因的完整编码区;qPCR 测定该基因在成虫不同组织[触角、头(去除触角)、胸、腹、足、翅]中的表达量;构建原核表达系统表达重组蛋白,利用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测蛋白的表达和纯度;运用荧光竞争结合实验测定重组蛋白与 35 种气味配体的结合能力。【结果】成功克隆了梨小食心虫的一个 Minus-C OBP 基因,命名为 *GmolOBP*14 (GenBank 登录号: MF066361)。*GmolOBP*14 开放阅读框长 411 bp,编码 136 个氨基酸,成熟蛋白具有 4 个保守的半胱氨酸残基,属于 Minus-C OBP 亚家族。*GmolOBP*14 在雌雄成虫的不同组织中均有表达,但在雄成虫翅和雌成虫触角中的表达量显著高于同性别的其他组织。重组蛋白 GmolOBP14 与气味配体的结合谱较窄,仅能与 16 种配体表现出不同程度的结合活性,其中与梨酯和十二醛的结合能力较强,解离常数 K_i 分别为 6.92 和 12.74 μmol/L;与癸醛、十四醛、顺-3-己烯-1-醇、苯甲醇和己酸丁酯有中等程度的结合活性,K_i 分别为 25.54, 20.61, 24.35, 23.44 和 23.33 μmol/L;GmolOBP14 对性信息素组分没有结合活性,提示该蛋白不参与对性信息素的感受和识别。【结论】根据 GmolOBP14 基因的组织表达特点及其重组蛋白的结合特性,推测 GmolOBP14 除具有选择性结合和运输寄主植物挥发物的作用外,还参与与嗅觉无关的生理过程。

关键词: 梨小食心虫; 气味结合蛋白; 基因表达; 蛋白纯化; 荧光竞争结合实验

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)07-0771-13

Molecular cloning, expression profiling and binding characterization of a Minus-C odorant binding protein from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae)

CHEN Xiu-Lin[1,2,#], SU Li[3,#], CHEN Li-Hui[1], LI Yi-Ping[1], WU Jun-Xiang[1,*], LI Guang-Wei[2,*]

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 3. Department of Plant Protection, Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract:【Aim】This study aims to clone the Minus-C odorant binding protein (OBP) gene of the

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272043); 延安大学博士科研启动项目(YDBK2017-37)

作者简介: 陈秀琳, 女, 1983 年生, 新疆喀什人, 博士研究生, 研究方向为农业害虫综合治理, E-mail: cxl840501@163.com; 苏丽, 女, 1969 年生, 广西玉林人, 博士, 副教授, 从事害虫综合治理教学与科研工作, E-mail: bluelily8899@163.com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding authors, E-mail: junxw@nwsuaf.edu.cn; xbbjb2010@sina.com

收稿日期 Received: 2017-12-14; 接受日期 Accepted: 2018-03-20

oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, and to measure its expression profiles in different adult tissues and the binding affinities of its recombinant protein with different ligands, so as to clarify its olfactory functions. 【Methods】 Based on the next generation sequencing of the female adult antenna of *G. molesta*, the complete coding sequence of a Minus-C OBP gene was cloned by using RT-PCR. The expression levels of this gene in different adult tissues (antenna, head with antennae removed, thorax, abdomen, leg and wing) of *G. molesta* were measured by qPCR. The recombinant protein was expressed by prokaryotic expression system and the purified protein was verified by SDS-PAGE and Western blot. The binding affinities of the recombinant protein with 35 ligands were analyzed using fluorescence competitive binding assay. 【Results】 A Minus-C OBP gene was successfully cloned from *G. molesta* and named *GmolOBP*14 (GenBank accession no. MF066361). The cDNA sequence of *GmolOBP*14 contains an ORF of 411 bp that encodes 136 amino acids including four conserved cysteine residues, and the encoded protein belongs to Minus-C OBPs subfamily. *GmolOBP*14 was expressed in different tissues of male and female adults, and had significantly higher expression levels in male wing and female antenna than in other tissues. The purified recombinant GmolOBP14 (rGmolOBP14) displayed binding abilities with 16 of the 35 tested ligands, and had higher binding affinities to pear ester and lauraldehyde with the dissociation constant K_i values of 6.92 and 12.74 μmol/L, respectively. rGmolOBP14 had medium binding abilities to decanal, tetradecanal, (*E*)-3-hexene-1-ol, benzyl alcohol and butyl hexanoate with the K_i values of 25.54, 20.61, 24.35, 23.44, and 23.33 μmol/L, respectively. rGmolOBP14 showed no binding activities to sex pheromones, suggesting that this protein is not involved in the perception and recognition of sex pheromones. 【Conclusion】 Based on the expression profiles of *GmolOBP*14 and the binding affinities of its recombinant protein to ligands, it is speculated that GmolOBP14 not only selectively binds and transports volatiles of the host plant but also participates in other physiological processes except for olfaction.

Key words: *Grapholita molesta*; odorant-binding protein; gene expression; protein purification; fluorescence competitive binding assay

灵敏的嗅觉系统在昆虫觅食、寻偶、交配以及躲避天敌与不适宜生境等生命过程中起着重要作用(Field *et al*., 2000)。气味结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)是昆虫触角感器中一类关键的运输蛋白,能够选择性地结合并将环境中的气味分子通过触角感器淋巴液运输至位于嗅觉感受神经元(olfactory sensory neurons, OSNs)上的气味受体(odorant receptors, ORs),激发嗅觉信号传导途径,从而引起昆虫对外界环境的反应(Vogt and Riddiford, 1981; 王桂荣等, 2004),气味结合蛋白是昆虫感知外界环境的基础(Pelosi *et al*., 2006)。近年来,随着基因组和转录组测序技术的迅速发展,已在鳞翅目、鞘翅目、双翅目、膜翅目、直翅目、半翅目等8个目的多种昆虫触角中鉴定到大量的气味结合蛋白基因(Hekmat-Scafe *et al*., 2002; Grosse-Wilde *et al*., 2011; Liu *et al*., 2012; Bengtsson *et al*., 2012; Gu *et al*., 2013; Cao *et al*., 2014; Niu *et al*., 2016; Cui *et al*., 2017; Chang *et al*., 2017; Sheng *et al*., 2017; Wang *et al*., 2017),并利用荧光替代实验、RNA 干扰(RNA interference, RNAi)和 CRISPR-Cas9 基因编辑技术探究了气味结合蛋白在选择性识别化学信息物质中的生理功能(Pelletier *et al*., 2010; Rebijith *et al*., 2016; Zhu *et al*., 2016; Dong *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2017),筛选获得了众多对目标昆虫有特异性引诱作用的化合物。

梨小食心虫 *Grapholita molesta* 是一种危害蔷薇科核果类和仁果类果树的世界性害虫,桃、梨和苹果受害最为严重(Natale *et al*., 2004)。目前,主要依靠化学农药防治梨小食心虫,辅以性信息素诱捕和迷向干扰(陆鹏飞等, 2010)。由于梨小食心虫营钻蛀危害,生活隐蔽,当幼虫蛀入果实后化学药剂防治效果较差,多频次、高剂量的喷施农药造成害虫抗药性、杀伤天敌和果品污染等一系列问题,因此探索出一种高效、无公害的新方法是目前防治梨小食心虫亟待解决的突出难题。梨小食心虫成虫具有典型的随季节性转移寄主危害的习性,灵敏的嗅觉系统在

定位寄主、选择产卵场所等活动中起着重要作用（Natale *et al.*, 2004），基于对挥发物介导的梨小食心虫嗅觉识别机制的研究有助于利用生态调控手段防治此虫。前人通过对梨小食心虫触角转录组测序获得了大量的气味结合蛋白基因，并对部分典型 OBPs 包括性信息素结合蛋白（pheromone binding proteins, PBPs）、普通气味结合蛋白（general odorant-binding proteins, GOBPs）和触角结合蛋白（antennal binding proteins, ABPX）的结合特性进行研究，筛选获得了几种对梨小食心虫有强烈电生理活性的挥发物组分（Zhang GH *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2014, 宋月芹等, 2014; Li *et al.*, 2016a, 2016b）。目前，对梨小食心虫 Minus-C OBPs 和 Plus-C OBPs 的功能未见研究。

本研究在注释梨小食心虫触角转录组数据获得候选 Minus-C OBP 基因的基础上，利用 RT-PCR 及 DNA 测序验证获得了目标基因的完整编码序列，通过构建原核表达系统、Ni 离子亲和层析技术获得了较高纯度的重组蛋白，利用荧光竞争结合实验测试了重组蛋白与性信息素和寄主植物挥发物的结合能力，推测梨小食心虫体内 Minus-C OBP 的嗅觉生理功能。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

供试梨小食心虫于 2008 年采自西北农林科技大学园艺试验站，供试虫源已在室内连续饲养 90 余代，每年春季采集野外种群进行复壮。幼虫用人工饲料在人工气候箱内饲养（杜娟等, 2010），饲养条件：温度 25 ± 1℃，相对湿度 65% ± 5%，光周期 15L∶9D。待老熟幼虫化蛹后分雌雄置于人工气候箱，成虫羽化后用 5% 蜂蜜水饲养至实验用虫。

1.2　主要试剂

RNAiso Trizol、反转录试剂盒 SuperScript™ First-Stand Synthesis System for RT-PCR、FastStart Universal SYBRGreen Master、DNA Marker、蛋白 Marker 和克隆载体 pMD® 19-T 购自 TaKaRa 公司；胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、DH5α 和 DE3(BL21)感受态细胞购自天根生化科技有限公司；Taq DNA 聚合酶、内切酶（*Bam*H Ⅰ 和 *Hin*dⅢ）、T4 DNA 连接酶、脱脂奶粉、抗 His 标签鼠单克隆抗体、Goat Anti-Rabbit IgG（H + L）、ECL Western Blot Kit 购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；cOmplete His-Tag Purification Resin 购自罗氏（Roche）公司，梨小食心虫性信息素购自 Bedoukian Research Inc.；荧光探针 N-苯基-1-萘胺（N-phenyl-1-naphthylamine, 1-NPN）购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.3　RNA 提取及模板 cDNA 合成

参考前人实验，收集梨小食心虫 3 日龄雌、雄成虫的触角（各 200 头，约 400 根触角）、头（各 30 个，去除触角）、胸（各 10）、腹（各 5）、足（各需 50 头虫，取前、中和后足）和翅（各需 80 头虫，取前翅与后翅）分别置于无 RNA 酶的离心管中，每个样品 3 次重复（Zhang GH *et al.*, 2012）。参照 RNA 提取试剂说明书提取总 RNA，用核酸蛋白浓度测定仪（SimpliNano, GE）测定总 RNA 的浓度及纯度（OD_{260}/OD_{280} 值），1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。利用 DNase Ⅰ 除去总 RNA 中的基因组 DNA 后反转录合成 cDNA 第 1 链，−80℃保存备用。

1.4　气味结合蛋白基因克隆

以 1.3 节梨小食心虫雌虫触角 cDNA 为模板，基于梨小食心虫雌虫触角转录组测序数据（GenBank 登录号：SRR1424578）（Li *et al.*, 2015）设计特异性引物（表 1）扩增候选 Minus-C OBP 基因的编码序列。RT-PCR 反应体系（25 μL）：cDNA 模板 1 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 1 μL, 10 × Taq Buffer 2.5 μL, $MgCl_2$（25 mmol/L）2 μL, dNTPs（10 μmol/L）0.5 μL，去离子水 16.7 μL, Taq DNA 聚合酶0.3 μL。PCR 反应程序：95℃预变性 5 min；94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s，35 个循环；最后 72℃延伸7 min。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，将符合预期大小的 DNA 片段进行纯化、回收后连接到克隆载体 pMD® 19-T 并转化至感受态细胞（DH5α），蓝白斑筛选后随机挑选 5 个阳性克隆在的 LB 液体培养基（含 50 μg/mL Amp）中过夜震荡培养（37℃ 220 r/min），然后将新鲜菌液送北京奥科生物科技有限公司测序。

1.5　气味结合蛋白基因序列分析

利用在线程序 ORF finder（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/）预测梨小食心虫气味结合蛋白基因的开放阅读框，在线软件 SignalP 4.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）预测气味结合蛋白的信号肽序列，运用 DNAMAN 软件进行序列比对，利用 MEGA 6.0.6 软件采用邻近法（neighbor-joining method）构建系统进化树（Bootstrap：1 000 次）（Tamura *et al.*, 2011）。

1.6 气味结合蛋白基因在梨小食心虫不同组织中的表达量分析

根据目的基因与内参基因 *β-actin* (GenBank 登录号: KF022227.1)标准曲线,发现扩增效率均在 90% ~110% 之间,证明目的基因引物与内参基因引物的特异性良好。因此,以梨小食心虫 *β-actin* 基因为内参,利用 CFX-96 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad)检测梨小食心虫气味结合蛋白基因在成虫不同组织中的表达量,qPCR 所需引物见表 1。qPCR 总反应体系(20 μL): SYBR Premix ExTaq™ 10 μL, cDNA 1 μL, 正反向引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, ddH_2O 7.4 μL。反应程序: 95℃预变性 3 min; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃延伸 30 s,共 40 个循环;最后在 60℃ ~95℃记录熔解曲线。每个样品 3 次技术重复、3 次生物学重复。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因在雌雄成虫不同组织中的相对表达量(Livak and Schmittgen, 2001),目的基因在成虫不同部位间的表达量差异用单因素方差分析(Turkey's)进行检验($\alpha = 0.05$),在雌雄间的表达量差异用独立样本 *T* 检验(independent *t*-test)检测($\alpha = 0.05$)。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in the research

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Usage of primers
OBP14-F	TTCAAAGGTTGCTGCATCTACA	开放阅读框扩增
OBP14-R	TTAGATTGTCACGCGTACATTA	Amplification of ORF
OBP14-qF	CTTTCACCACCACCGCTG	qPCR
OBP14-qR	CGCAAGATTCCATACCCA	
Actin-F	CTTTCACCACCACCGCTG	内参基因扩增
Actin-R	CGCAAGATTCCATACCCA	Amplification of the reference gene
OBP14-eF	CG GGATCCCTCGAACCTGAAAAAACCGCG	蛋白原核表达
OBP14-eR	CC AAGCTTGGTTAGATTGTCACGCGTACATTA	Prokaryotic expression of protein

*Bam*H Ⅰ(GGATCC)和 *Hind* Ⅲ(AAGCTT)的酶切位点用下划线标记 Restriction sites of *Bam*H Ⅰ (GGATCC) and *Hind* Ⅲ (AAGCTT) are underlined.

1.7 气味结合蛋白的原核表达与蛋白纯化

以 1.3 节梨小食心虫雌虫触角 cDNA 为模板,利用带有酶切位点的特异性引物扩增梨小食心虫气味结合蛋白基因去信号肽的核苷酸序列。将扩增产物纯化回收后连接至克隆载体 pMD® 19-T,并转化到感受态细胞 DH5α、蓝白斑筛选和震荡培养后提取质粒 DNA 并测序验证。将含有目标片段的 pMD® 19-T/*GmolOBP*14 重组质粒 DNA 和 pET-28a(+)质粒 DNA 用限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ和 *Hind* Ⅲ在 37℃酶切 4 h,纯化回收后在 T4 DNA 连接酶的作用下将目的片段连接到表达载体 pET-28a(+)上。最后将重组表达质粒转化到 BL21(DE3)感受态细胞,涂板培养后挑取单菌落于 LB 培养液中振荡培养(37℃ 220 r/min, 12 ~16 h)。将小量培养后的菌液按 1∶100(v/v)接种至 750 mL 含有 LB 液体培养基中(含 50 μg/mL Kan),37℃ 220 r/min 振荡培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 使诱导培养 5 h,收集菌体后用超声波进行破碎处理(500 W, 45 次,每次 10 s,间隔 10 s),4℃ 12 000 ×g 离心 30 min 后分别收集上清与沉淀, SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况。重组蛋白表达条件的优化,变性,复性,透析,浓度测定,保存等参照以往研究 OBPs 的方法(Zhang TT *et al*., 2012; 李广伟, 2016)进行。

1.8 Western blot 免疫印迹检测

利用半干法转膜(电流 300 mA,转膜时间 60 min)使重组蛋白转移至固相载体 PVDF 膜上。转膜结束后,将 PVDF 膜浸泡在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液中过夜封闭(4℃),再用 1∶8 000(v/v)稀释的抗 His 标签鼠抗单克隆抗体在恒温摇床上震荡孵育 2 h (25℃ 60 r/min),然后用含有 1% Triton X-100 的 TBST 洗脱液洗膜 5 次(25℃, 恒温摇床 60 r/min, 每次 5 min),再加入 1∶50 000 (v/v)稀释的山羊抗鼠二抗室温孵育 2 h,TBST 洗脱液洗膜 5 次(25℃,恒温摇床 60 r/min, 每次 5 min),最后加入免疫印迹化学发光液在 UVP 化学发光成像系统(ChemiScope 2950, 上海勤翔)中显色观察。

1.9 荧光竞争结合实验

选用 35 种配体,其中 4 种是梨小食心虫的性信息素,31 种是梨小食心虫主要寄主桃、梨的挥发物

成分(Carde *et al*., 1979; 田长平等, 2009; 杜娟, 2015),利用 F-4600 荧光分光光度计(岛津, 日本)测定梨小食心虫气味结合蛋白重组蛋白与这 35 种气味配体分子的结合能力。分光光度计样品池内安装 1 cm 光通径的四通面石英比色杯(容积 4 mL)。设定激发波长 337 nm,扫描波长 370 ~ 550 nm,发射光与激发光狭缝宽度均设为 10 nm,电压 400 V。将重组蛋白用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)稀释至 2 μmol/L 的测试浓度。(1)首先测定重组蛋白与荧光探针 1-NPN 的解离常数:向 2 μmol/L 蛋白溶液中以 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 和 24 μmol/L 的浓度梯度加入 1-NPN 至蛋白与荧光探针的结合达到饱和,分别记录每个梯度下产生的最大荧光强度值,根据斯卡查德方程(Scatchard)计算 1-NPN 与蛋白的解离常数 K_d。(2)测定重组蛋白和气味配体的解离常数:向比色杯中加入 2 mL 2 μmol/L 重组蛋白溶液和终浓度为 2 μmol/L 的荧光探针 1-NPN,充分混合静置1 min,然后记录初始荧光值。气味挥发物标样以终浓度 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 和 35 μmol/L 的梯度(性信息素的浓度梯度: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 和 14 μmol/L)加入到蛋白和 1-NPN 的混合溶液中,记录最大的荧光强度值,每个样品 3 次重复。假设蛋白活性为 100%,在饱和情况下蛋白和配基结合的比例为 1∶1,根据公式 $K_i = [IC_{50}]/(1 + [1\text{-NPN}]/K_{1\text{-NPN}})$ 计算蛋白与气味配体的解离常数 K_i,其中 IC_{50} 为气味配体使荧光值降低到初始荧光值一半时的浓度(配基能替换 50% 的 1-NPN 时的浓度),[1-NPN] 为未结合的 1-NPN 浓度, $K_{1\text{-NPN}}$ 为 GmolOBP14 与 1-NPN 的解离常数(Qiao *et al*., 2011)。

2　结果

2.1　基因克隆与序列分析

对注释梨小食心虫触角转录组数据获得的一个候选 OBP 基因进行克隆,并利用传统 DNA 测序校正了转录组测序和拼接组装中的错误碱基,获得了该基因的完整编码序列,命名为 *GmolOBP*14 (GenBank 登录号: MF066361)。*GmolOBP*14 开放阅读框(ORF)全长 411 bp,编码 136 个氨基酸残基,氨基酸序列的 N-末端有由 22 个氨基酸残基组成的信号肽序列(图 1),预测的分子量为 15.8 kD,等电点为 6.87,呈弱酸性。

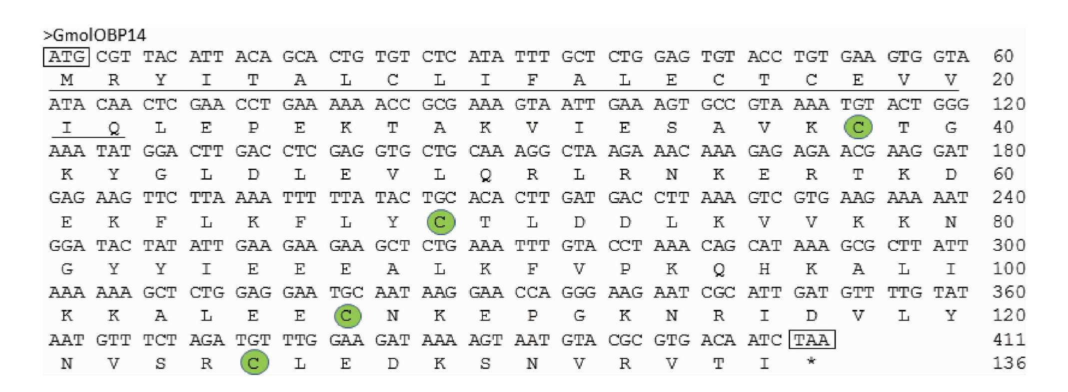


图 1　梨小食心虫 *GmolOBP*14 的核苷酸及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *GmolOBP*14 of *Grapholita molesta*

下划线表示预测的信号肽序列,绿色圆圈表示 4 个保守的半胱氨酸残基,方框表示起始密码子与终止密码子。The predicted signal peptide sequence is underlined, four conserved cysteines are marked by a green circle background, and the initiation and termination codons are marked by rectangles.

2.2　GmolOBP14 多序列比对及进化树分析

与其他昆虫的 Classic OBPs 和 Minus-C OBPs 多序列比对发现,GmolOBP14 有 4 个保守的半胱氨酸残基,氨基酸序列中第 2 位和第 5 位的半胱氨酸残基分别被赖氨酸(lysine, K)和异亮氨酸(isoleucine, I)所取代,GmolOBP14 在序列结构上属于 Minus-C OBPs 亚家族蛋白(图 2)。将 GmolOBP14 与其他昆虫的 16 种 OBPs 构建系统进化树发现,所选择的 OBPs 分别聚类到 3 个不同的进化枝,即“Classic OBP”,“Minus-C OBP”和“Plus-C OBP”进化枝(图 3)。本研究克隆获得的 GmolOBP14 与沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus* EhipOBP 等聚类到独立的 Minus-C OBPs 进化枝(图 3),表明它们之间在进化关系上更加紧密,与多序列比对结果一致。

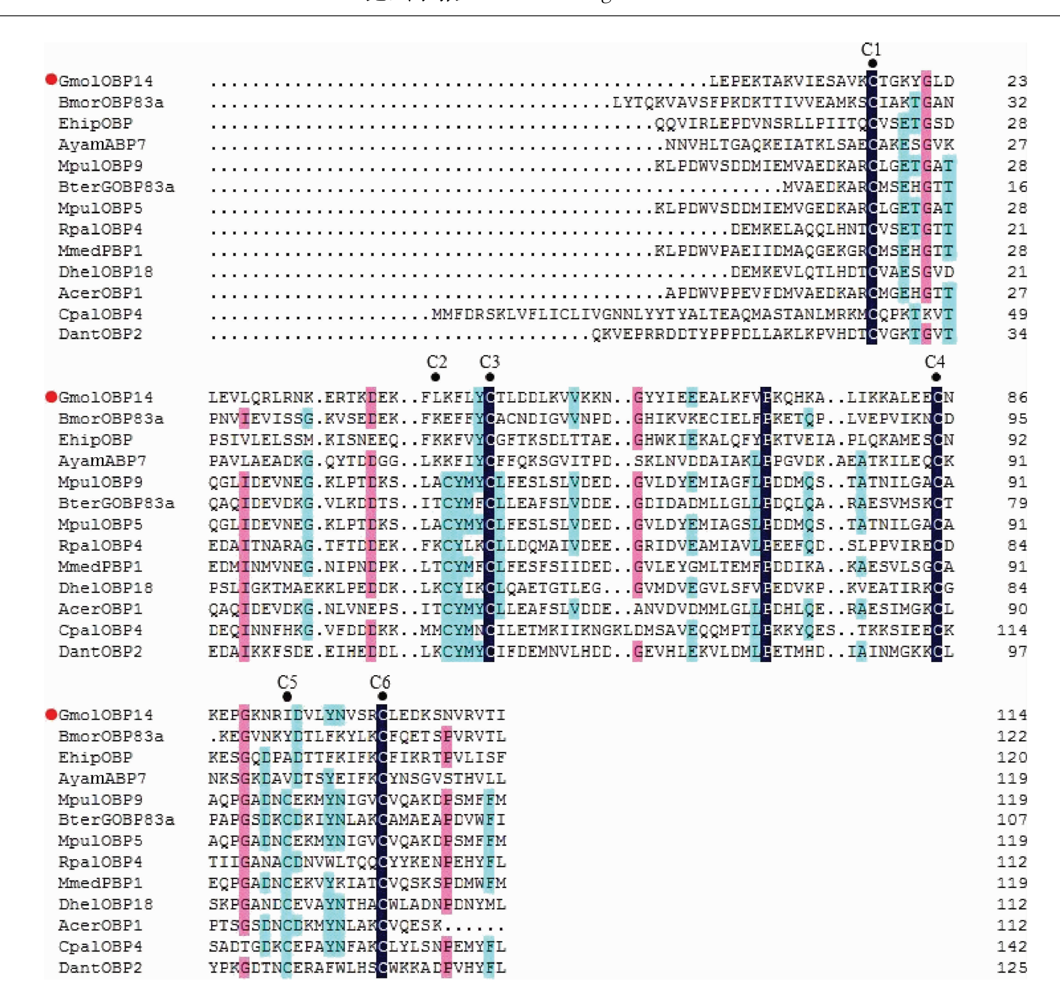


图 2 GmolOBP14 与其他昆虫 OBPs 的氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of GmolOBP14 with OBPs from other insect species

OBP 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of the OBPs and their GenBank accession numbers: GmolOBP14: 梨小食心虫 *Grapholita molesta* (MF066361); BmorOBP83a: 家蚕 *Bombyx mori* (XP_004932340.1); EhipOBP: 沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus* (AOG12871.1); AyamABP7: 日本柞蚕 *Antheraea yamamai* (ADO95155.1); MpulOBP9: 斑痣悬茧蜂 *Meteorus pulchricornis* (AQN78387.1); BterGOBP83a: 欧洲熊蜂 *Bombus terrestris* (XP_003393962.3); MpulOBP5: 斑痣悬茧蜂 *Meteorus pulchricornis* (AQN78383.1); RpalOBP4: 棕榈象甲 *Rhynchophorus palmarum* (AAO64978.1); MmedPBP1: 中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* (ABM05973.2); DhelOBP18: 花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* (AIX97064.1); AcerOBP1: 东方蜜蜂 *Apis cerana* (ABD97847.1); CpalOBP4: 大草蛉 *Chrysopa pallens* (AKW47201.1); DantOBP2: 葱蝇 *Delia antiqua* (BAI82442.1). 深蓝色、粉色、浅蓝色阴影和无阴影分别表示氨基酸序列一致性为 100%, 75%, 50% 和 50% 以下; 6 个保守的半胱氨酸残基以 C1 – C6 标记。The amino acids with 100%, 75%, 50%, and below 50% identity are in dark blue, pink and light blue shades, and without shade, respectively. The six conserved cysteines are indicated with C1 – C6.

2.3 *GmolOBP*14 的表达特点分析

根据目的基因与内参基因 *β-actin* 标准曲线,发现扩增效率均在 90% ~110% 之间,证明目的基因引物与内参基因引物的特异性良好。因此,以梨小食心虫 *β-actin* 基因为内参,运用 qPCR 测定了 *GmolOBP*14 在成虫不同组织中的相对表达量。测定结果表明,*GmolOBP*14 在梨小食心虫成虫不同组织中均有表达,在雄虫翅中的表达量显著高于雄虫其他组织,分别是雄虫触角、头(去除触角)、胸、腹和足部中表达量的 6.97, 36.17, 52.36, 39.88 和 3.39 倍;*GmolOBP*14 在雌虫触角中的表达量显著高于雌虫其他组织,分别是头(去除触角)、胸、腹、足和翅部中表达量的 7.04, 8.75, 28.06, 2.24 和 2.27 倍。*GmolOBP*14 在梨小食心虫成虫触角、胸、翅和足中的表达量存在性别差异,在雌蛾触角和胸部中的表达量显著高于雄蛾($P=0.001$),在雄蛾翅和足中的表达量显著高于雌蛾(分别为 $P=0.041$, $P=0.019$)(图 4)。

2.4 GmolOBP14 的原核表达及纯化

将成功构建的原核表达重组质粒 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 DNA 转化到感受态细胞 BL21(DE3),经 IPTG 诱导表达后用 15% SDS-PAGE 检

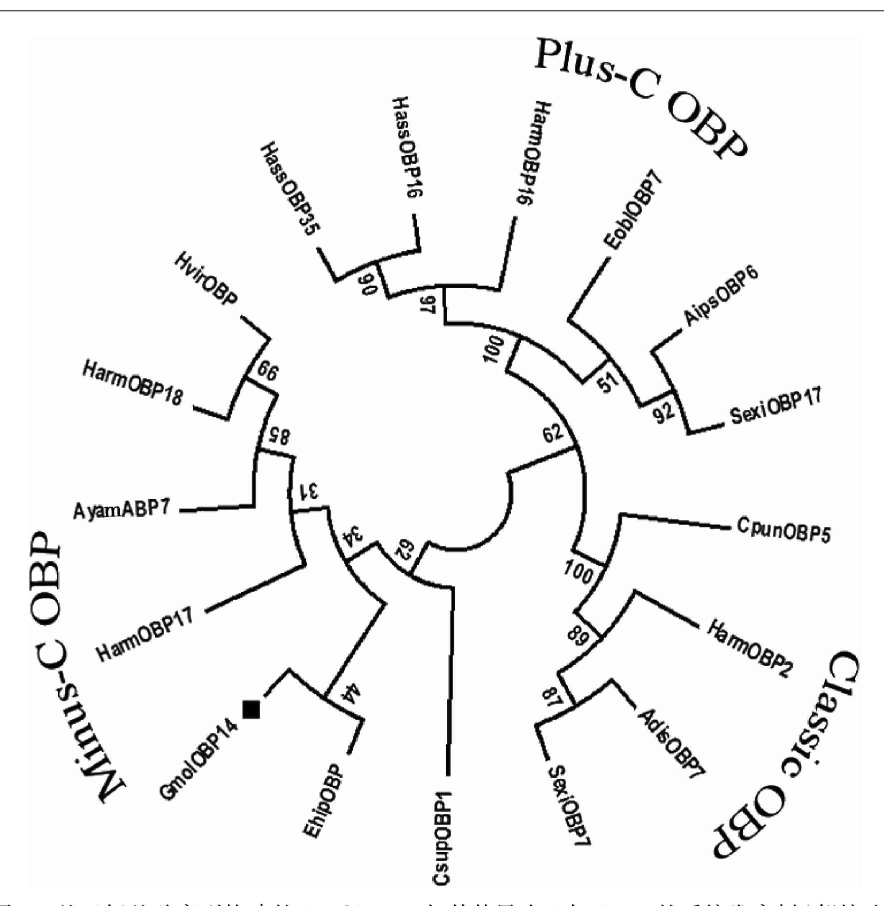


图 3　基于氨基酸序列构建的 GmolOBP14 与其他昆虫已知 OBPs 的系统发育树(邻接法)

Fig. 3　Phylogenetic tree based on the amino acid sequence of GmolOBP14 and OBPs from other insects using neighbor-joining method

OBPs 来源及 GenBank 登录号 The origin of OBPs and their GenBank accession numbers：梨小食心虫 *Grapholita molesta*（GmolOBP14：MF066361）；沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus*（EhipOBP：AOG12871.1）；日本柞蚕 *Antheraea yamamai*（AyamABP7：ADO95155.1）；棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（HarmOBP2：AEB54586.1；HarmOBP16：JQ753074；HarmOBP17：AFI57166；HarmOBP18：AFI57167）；二化螟 *Chilo suppressalis*（CsupOBP1：AGK24577.1）；烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*（HvirOBP：ACX53795.1）；桃蛀螟 *Conogethes punctiferalis*（CpunOBP5：ALC76545.1）；双委夜蛾 *Athetis dissimilis*（AdisOBP7：ALZ45422.1）；甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（SexiOBP7：AGH70103.1；SexiOBP17：AKT26495.1）；小地老虎 *Agrotis ipsilon*（AipsOBP6：AGR39569.1）；茶尺蠖 *Ectropis obliqua*（EoblOBP7：ALS03855.1）；烟夜蛾 *Helicoverpa assulta*（HassOBP16：AGC92791.1；HassOBP35：ASA40073.1）. 各分支上的数字为自举值(1 000 次重复抽样检验)。Numerals on each node represent bootstrap values from 1 000 replicates.

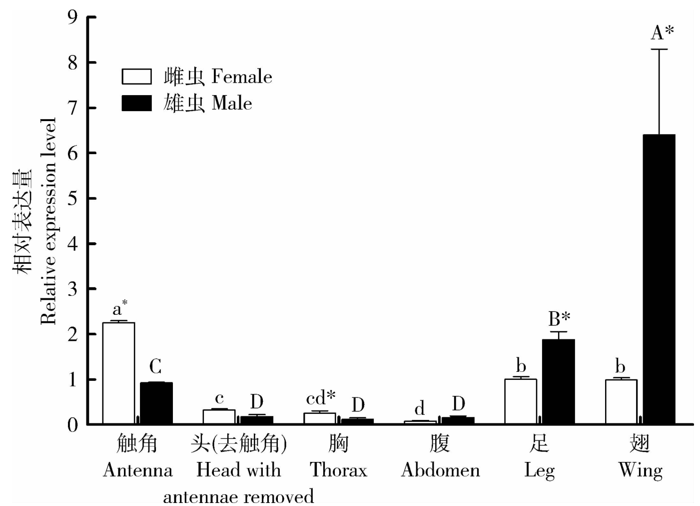


图 4　*GmolOBP*14 在梨小食心虫成虫不同组织中的相对表达量

Fig. 4　Relative expression level of *GmolOBP*14 in various tissues of *Grapholita molesta* adults

柱上小写字母和大写字母分别表示雌虫和雄虫不同组织间的表达量差异显著(Tukey 氏检验，$\alpha=0.05$)。星号表示同一组织雌雄虫之间表达量差异显著(独立样本 t 检验，$\alpha=0.05$)。Lowercase and capital letters above bars indicate significant difference in expression levels among different tissues of female and male adults, respectively (Tukey's test, $\alpha=0.05$), while the asterisks indicate significant difference in expression levels in the same tissue between two sexes (independent t-test, $\alpha=0.05$).

测发现重组蛋白 GmolOBP14 以包涵体的形式存在(图 5：A)。重组蛋白经 8 mol/L 尿素变性、胱氨酸/半胱氨酸系统复性、纯化和透析后成功获得了大小约 16 kD 的单一条带。Western blot 免疫印迹检测也在相应位置产生特异性条带,表明此特异条带为目的条带(图 5：B)。

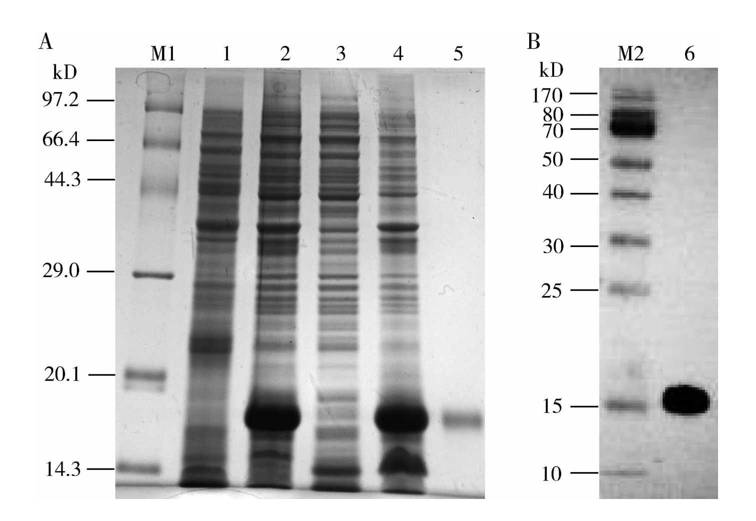


图 5 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 表达产物 SDS-PAGE 分析(A)和 Western blot 检测(B)

Fig. 5 SDS-PAGE analysis (A) and Western blot detection (B) of recombinant pET-28a(+)/*GmolOBP*14

M1, M2：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 1：未经 IPTG 诱导的 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 菌体 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 before IPTG induction; 2：IPTG 诱导的 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 菌体 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 after IPTG induction; 3：IPTG 诱导的 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 菌体上清 Supernatant of pET-28a(+)/*GmolOBP*14 induced by IPTG after sonication; 4：IPTG 诱导的 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 菌体沉淀 Sediment of pET-28a(+)/*GmolOBP*14 induced by IPTG after sonication; 5：纯化后的 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 融合蛋白 Purified fusion protein of pET-28a(+)/*GmolOBP*14; 6：Western bolt 检测纯化后的 pET-28a(+)/*GmolOBP*14 融合蛋白 Purified fusion protein of pET-28a(+)/*GmolOBP*14 detected by Western blot.

2.5 GmolOBP14 与气味配体的结合能力

重组蛋白 GmolOBP14 在 337 nm 激发光波长下自身无明显的内源荧光信号,当以 2 μmol/L 的浓度梯度逐次加入 1-NPN 溶液时在 410 nm 进行荧光扫描。荧光强度值的增幅随加入 1-NPN 浓度的不断增大而逐渐增强,最终蛋白和 1-NPN 的结合达到饱和,通过结合曲线和 Scatchard 方程计算出 GmolOBP14 与 1-NPN 的解离常数为 15.35 μmol/L(图 6)。

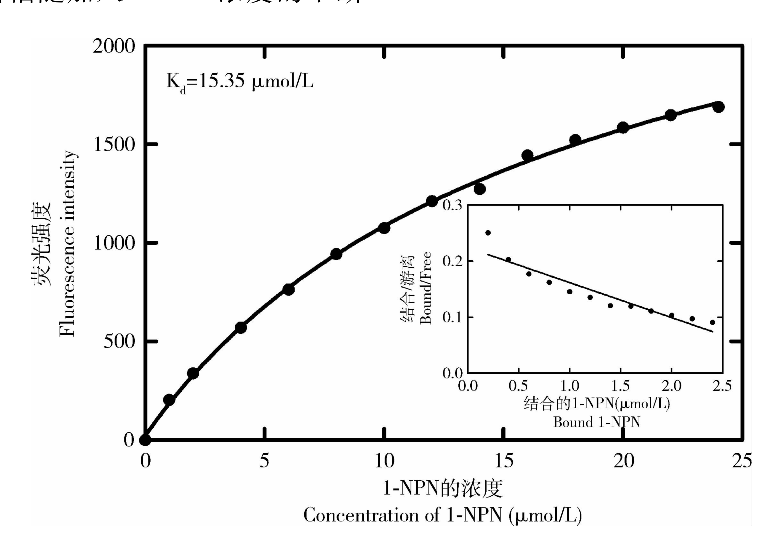


图 6 GmolOBP14 与 1-NPN 的结合曲线及斯卡查德方程

Fig. 6 Binding curve of recombinant GmolOBP14 with 1-NPN and Scatchard plotting

从荧光竞争结合实验可以看出,重组蛋白 GmolOBP14 与梨小食心虫性信息素组分乙酸-顺-8-十二碳烯酯[(*Z*)-8-dodecenyl acetate, *Z*8-12:AC]、乙酸-反-8-十二碳烯酯[(*E*)-8-dodecenyl acetate,

E8-12：AC］、顺-8-十二碳烯-1-醇［（Z）-8-dodecenyl alcohol，Z8-12：OH］和十二烷醇（dodecanol，12：OH）没有结合活性，表明 GmolOBP14 不参与性信息素的感受、识别和运输（图 7：A）。在待测的 31 种桃、梨和苹果挥发物中，仅有 16 种气味配体能将荧光探针 1-NPN 从重组 GmolOBP14 蛋白溶液中替换

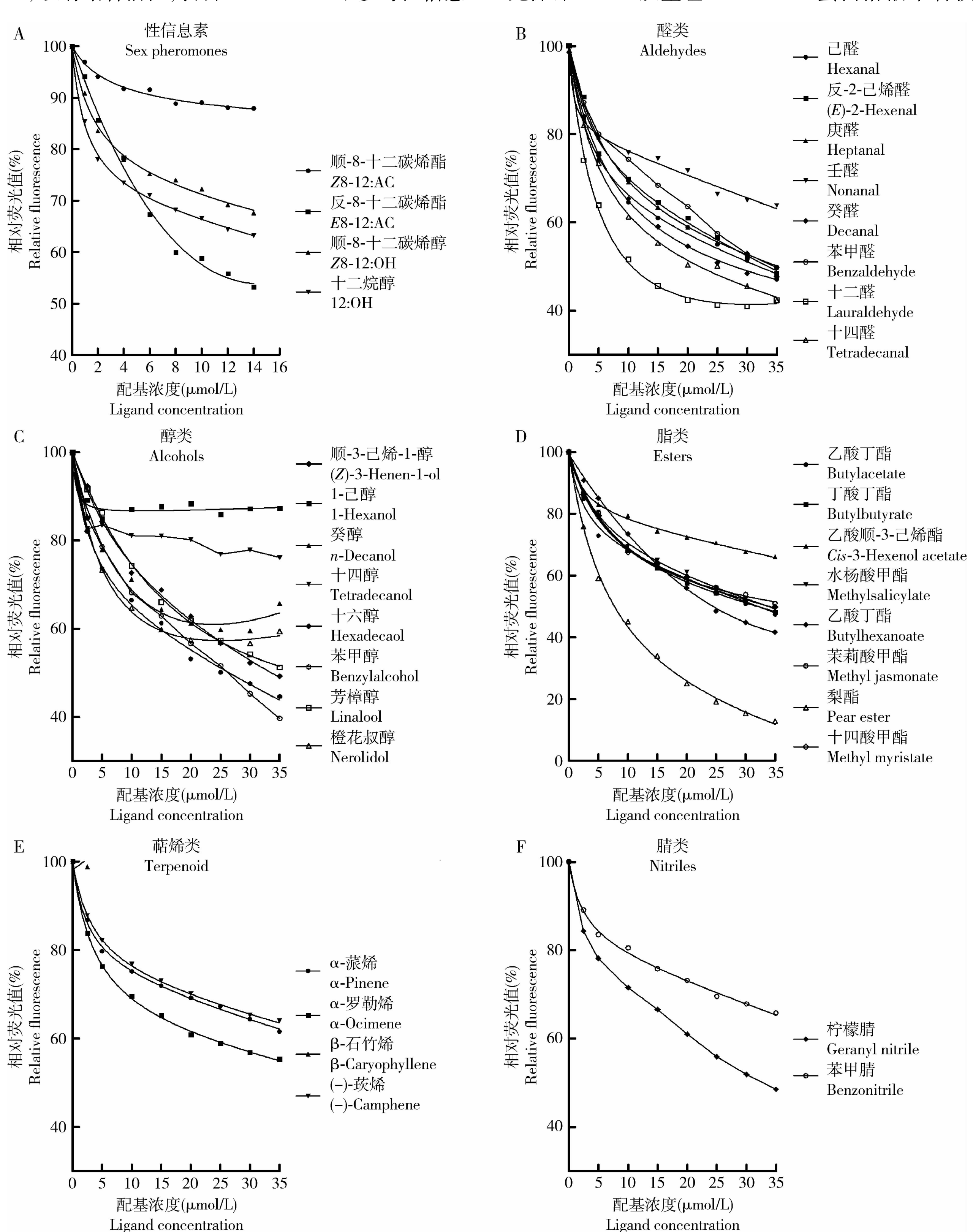


图 7　气味配基分子竞争 GmolOBP14 与 1-NPN 的结合

Fig. 7　Competitive binding of odorant molecules and 1-NPN with recombinant protein GmolOBP14

50%以上,表明 GmolOBP14 的气味结合谱较窄,具有选择性识别寄主植物挥发物的特性(表 2,图 7:B–F)。重组蛋白 GmolOBP14 与部分醛、醇、酯和腈类配基有结合活性,其中与梨酯和十二醛的结合能力较强,解离常数 K_i 分别为 6.92 和 12.74 μmol/L;与癸醛、十四醛、顺-3-己烯-1-醇、苯甲醇和己酸丁酯具有中等的结合能力,K_i 分别为 25.54, 20.61, 24.35, 23.44 和 23.33 μmol/L;与反-2-己烯醛、己醛、十六醇、乙酸丁酯、丁酸丁酯、水杨酸甲酯、十四酸甲酯和柠檬腈的结合能力较弱,K_i 均在 30.00 μmol/L 以上(表 2)。

表 2 重组蛋白 GmolOBP14 与气味挥发物的结合能力

Table 2 Binding ability of the recombinant GmolOBP14 with volatile odor molecules

气味标样 Ligands	来源 Source	CAS 号 CAS accession no.	纯度(%) Purity	IC_{50} (μmol/L)	K_i (μmol/L)
性信息素 Sex pheromones					
乙酸-顺-8-十二碳烯酯(*Z*)-8-Dodecenyl acetate	Finetech	28079-04-1	>95.0 (AR)	–	–
乙酸-反-8-十二碳烯酯(*E*)-8-Dodecenyl acetate	Finetech	38363-29-0	>95.0 (AR)	–	–
顺-8-十二碳烯-1-醇(*Z*)-8-Dodecenyl alcohol	Finetech	40642-40-8	>98.0 (AR)	–	–
十二碳-1-醇 Dodecanol	Finetech	112-53-8	>99.0 (GC)	–	–
醛类 Aldehydes					
反-2-己烯醛(*E*)-2-Hexenal	Alfa	85761-70-2	98.0 (AR)	34.66±0.27	32.40
己醛 Hexanal	TCI	66-25-1	>95.0 (AR)	32.17±0.16	30.07
苯甲醛 Benzaldehyde	Aladdin	100-52-7	≥99.5 (GC)	–	–
庚醛 Heptanal	Aladdin	111-71-7	97.0 (AR)	34.42±0.60	32.17
壬醛 Nonanal	Sigma	124-19-6	95.0 (AR)	–	–
癸醛 Decanal	Aladdin	112-31-2	97.0 (AR)	27.32±0.41	25.54
十二醛 Lauraldehyde	Sigma	112-54-9	98.0 (AR)	13.63±0.06	12.74
十四醛 Tetradecanal	Alfa	124-25-4	95.0 (AR)	22.06±0.69	20.61
醇类 Alcohols					
顺-3-己烯-1-醇(*Z*)-3-Hexen-1-ol	Sigma	928-96-1	98.0 (AR)	26.05±0.38	24.35
1-己醇 1-Hexanol	TCI	111-27-3	>98.0 (AR)		
苯甲醇 Benzyl alcohol	Alfa	100-51-6	>99.0 (GC)	25.08±0.63	23.44
芳樟醇 Linalool	Alfa	78-70-6	>99.0 (GC)	–	–
癸醇 *n*-Decyl alcohol	Alfa	112-30-1	>99.0 (GC)	–	–
十四醇 Tetradecanol	Aladdin	112-72-1	>98.0 (AR)	–	–
橙花叔醇 Nerolidol	Sigma	7212-44-4	>98.0 (AR)	–	–
十六醇 Hexadecanol	Aladdin	36653-82-4	>99.0 (GC)	24.00±0.68	31.78
酯类 Esters					
乙酸丁酯 Butyl acetate	Aladdin	123-86-4	99.0 (AR)	33.80±0.38	31.59
梨酯 Pear ester	TCI	3025-30-7	≥97.0 (GC)	7.41±0.17	6.92
乙酸-顺-3-己烯酯 *Cis*-3-Hexenyl acetate	TCI	3681-71-8	>97.0 (GC)	–	–
丁酸丁酯 Butyl butyrate	Aladdin	109-21-7	>99.0 (GC)	31.54±0.52	30.01
水杨酸甲酯 Methyl salicylate	Sigma	119-36-8	≥99.0 (GC)	34.51±0.59	32.26
己酸丁酯 Butyl hexanoate	Aladdin	626-82-4	≥99.5 (GC)	24.96±0.90	23.33
茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate	Sigma	3994-52-2	98.0 (AR)	–	–
十四酸甲酯 Methyl myristate	TCI	124-10-7	≥95.0 (GC)	33.46±0.59	31.27
十六酸甲酯 Methyl palmitate	Aladdin	124-10-7	≥98.0 (GC)	–	–
萜烯类 Terpenes					
α-蒎烯 α-Pinene	Sigma	80-56-8	98.0 (AR)	–	–
α-罗勒烯 α-Ocimene	Aladdin	13877-91-3	≥90.0 (AR)	–	–
(–)-莰烯(–)-Camphene	Sigma	79-92-5	≥98.0 (GC)	–	–
β-石竹烯 β-Caryophyllene	Sigma	87-44-5	97.0 (AR)	–	–
腈类 Nitriles					
苯甲腈 Benzonitrile	TCI	100-47-0	>99.0 (AR)	–	–
柠檬腈 Geranyl nitrile	Aladdin	5146-66-7	98.0 (AR)	34.52±0.24	33.19

IC_{50}:配体置换 50% 1-NPN 时的浓度 The concentration of ligand halving the initial fluorescence intensity; K_i:解离常数 Dissociation constant. AR:分析纯 Analytical reagent; GC:气相色谱 Gas chromatography; –:不结合 Non-binding.

3 讨论

本研究在注释梨小食心虫触角转录组的基础上克隆了一个 Minus-C OBP 基因 *GmolOBP*14，同时也是在梨小食心虫触角中发现的唯一一种 Minus-C OBP。与典型 OBPs 的特征序列 C1-X_{20-66}-C2-X_3-C3-X_{21-43}-C4-X_{8-14}-C5-X_8-C6 和 C1-X_{15-39}-C2-X_3-C3-X_{21-44}-C4-X_{7-12}-C5-X_8-C6（X 为除 Cys 以外的其他氨基酸）相比，GmolOBP14 的氨基酸序列中仅有 4 个保守的 Cys 残基，其第 2 位和第 5 位的 Cys 被其他氨基酸所取代（Hekmat-Scafe *et al*., 2002）。经 BLASTx 序列比对发现，GmolOBP14 与其他昆虫已知 OBPs 的氨基酸序列一致性非常低，如：GmolOBP14 与家蚕 *Bombyx mori* BmorOBP83a 的氨基酸序列一致性最高，但仅为 31%（Gong *et al*., 2009）；与沙棘木蠹蛾 *Eogystia hippophaecolus* EhipOBP 的氨基酸序列一致性其次，仅为 28%（Hu *et al*., 2016）。前人对二化螟 *Chilo suppressalis*、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和美洲大蠊 *Periplaneta americana* 的 Minus-C OBPs 研究也发现，此类蛋白与同种个体中 Classical OBPs 和 Plus-C OBPs 的氨基酸序列一致性较低（魏丹等，2013；Li *et al*., 2013，2017）。鳞翅目昆虫的 Minus-C OBPs 数量明显少于鞘翅目、蜚蠊目昆虫，OBPs 向着产生更多 Cys 残基的方向进化，形成含有更多二硫键支撑结构的 OBPs 以适应对特殊气味物质的识别（Gong *et al*., 2009；Grosse-Wilde *et al*., 2011；Liu *et al*., 2012；Cao *et al*., 2014）。荧光结合实验表明 GmolOBP14 对气味配体有强烈的选择识别特性，前人研究发现棉铃虫 2 个 MIinus-C OBPs（HarmOBP17 与 HarmOBP18）、二化螟 MIinus-C OBP（CsupOBP1）对寄主挥发物 β-紫罗兰酮有较强的结合能力，表明它们在对识别寄主植物气味中起作用（魏丹等，2013；Li *et al*., 2013）。GmolOBP14 对梨酯和十二醛表现出强烈的结合活性，对癸醛等 14 种寄主植物挥发物表现出中等或微弱的结合活性，对 4 种性信息素和其他 15 种气味配体没有结合活性。GmolOBP14 对气味物质有强烈结合活性，结合谱较 GmolGOBP1，GmolPBP2，GmolOBP8，GmolOBP11 和 GmolOBP15 等典型 OBPs 窄，推测 GmolOBP14 在特异性识别寄主植物挥发物方面发挥着一定作用。

明确基因表达谱是研究基因功能的重要途径，基因的生理功能通常与其表达的组织有关（Hua *et al*., 2012）。*GmolOBP*14 在雄成虫翅部和雌虫触角中的表达量最高，在头（去触角）、胸、腹和足中有小量表达。根据前人对昆虫 OBPs 基因在不同组织中的表达量测定可以发现，绝大部分 OBPs 基因在昆虫触角中特异性或高丰度表达，也有部分 OBPs 基因在其他非嗅觉功能的组织或器官中表达，如 *CsupOBP*1 在二化螟幼虫头部及成虫足和翅中高丰度表达，推测 *CsupOBP*1 与调节雌虫在寄主植物叶片上的产卵有关；胡蜂 *Polistes dominulus PdomOBP*1 和大黄蜂 *Vespa carbro* OBPs 基因在足跗节和翅中表达（Calvello *et al*., 2003，2005）；埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 OBPs 和小地老虎 *Agrotis ypsilon AipsOBP*6 在性腺中表达，推测与性信息素释放后的运输及雌蛾检测自身释放性信息素的过程有关（Li *et al*., 2008；Gu *et al*., 2013）。梨小食心虫雄成虫具有振翅挤压尾刷释放信息素吸引雌虫交配的习性（Nishida *et al*., 1982），*GmolOBP*14 在雄虫翅中存在高表达量，推测 *GmolOBP*14 在雄虫翅中的高丰度表达与调控雄虫振翅释放信息素的行为有关。此外，*GmolOBP*14 在雌虫触角中的表达量显著高于雄虫，与棉铃虫 *HarmABP*1 雌虫触角中的表达量显著高于雄虫触角的研究结果（Zhang *et al*., 2011）一致，表明 *GmolOBP*14 在雌虫定位产卵场所起到作用。

在供试的 31 种桃、梨和苹果挥发物中，GmolOBP14 对梨酯具有强烈的结合活性，解离常数为 6.92 μmol/L，表明梨酯是 GmolOBP14 的重要配体。已有研究表明，梨小食心虫的 GmolOBP8，GmolOBP11 和 GmolOBP15 均可结合 4 种性信息素组分的几种，与本研究中的其他 30 种气味配体的结合谱较广（除梨酯外），分别对 25，26 和 22 种气味配体有结合能力。在本研究中添加了一种气味配体——梨酯，梨酯是梨属果实成熟时的挥发物组分，对梨小食心虫的近缘物种苹果蠹蛾 *Cydia pomonella* 的怀卵雌虫具有强烈的引诱作用（Yang *et al*., 2004；Knight *et al*., 2005；Pasqualini *et al*., 2005），但梨酯并不能引起梨小食心虫明显的行为反应。出现这种现象的原因可能有：一是梨小食心虫对寄主植物的响应是基于对植物化学指纹图谱的识别，梨酯仅是构成寄主植物化学指纹图谱的一种组分，故单组分并不能在行为上表现出引诱活性，类似苯甲腈单组分或桃梢挥发物乙酸-顺-3-己烯酯、顺-3-己烯醇、反-2-己烯醛和苯甲醛的混合物（69.84∶14.64∶13.26∶2.26，m/m）并不能引起梨小食心虫的行为反应，但当加入质量分数为 0.14% 的苯甲腈后混合

物对梨小食心虫的引诱效果与天然桃树嫩梢相当(Il'ichev *et al.*, 2009);二是在长期的进化过程中,梨小食心虫的嗜食性寄主植物发生了变化,即由苹果转变为桃树、梨树等其他蔷薇科果树,梨酯虽然能与气味结合蛋白强烈结合,但并不能引起行为反应。GmolOBP14 具体的嗅觉生理功能还有待利用基因沉默或基因编辑实验进行验证。

参考文献(References)

Bengtsson JM, Trona F, Montagné N, Anfora G, Ignell R, Witzgall P, Jacquin-Joly E, 2012. Putative chemosensory receptors of the codling moth, *Cydia pomonella*, identified by antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 7(2): e31620.

Calvello M, Brandazza A, Navarrini A, Dani FR, Turillazzi S, Felicioli A, Pelosi P, 2005. Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 35(4): 297-307.

Calvello M, Guerra N, Brandazza A, D'Ambrosio C, Scaloni A, Dani FR, Turillazzi S, Pelosi P, 2003. Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60(9): 1933-1943.

Cao DP, Liu Y, Wei JJ, Liao XY, Walker WB, Li JH, Wang GR, 2014. Identification of candidate olfactory genes in *Chilo suppressalis* by antennal transcriptome analysis. *Int. J. Biol. Sci.*, 10(8): 846-860.

Carede AM, Baker TC, Carde RT, 1979. Identification of a four-component sex pheromone of the female oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Chem. Ecol.*, 5(3): 423-427.

Chang XQ, Nie XP, Zhang Z, Zeng FF, Lv L, Zhang S, Wang MQ, 2017. *De novo*, analysis of the oriental armyworm *Mythimna separata*, antennal transcriptome and expression patterns of odorant-binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom.*, 22: 120-130.

Cui HH, Gu SH, Zhu XQ, Wei Y, Liu HW, Khalid HD, Guo YY, Zhang YJ, 2017. Odorant-binding and chemosensory proteins identified in the antennal transcriptome of *Adelphocoris suturalis* Jakovlev. *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom.*, 24: 139-145.

Dong K, Sun L, Liu JT, Gu SH, Zhou JJ, Yang RN, Dhiloo KH, Gao XW, Guo YY, Zhang YJ, 2017. RNAi-induced electrophysiological and behavioral changes reveal two pheromone binding proteins of *Helicoverpa armigera* involved in the perception of the main sex pheromone component *Z*11-16:Ald. *J. Chem. Ecol.*, 43(2): 207-214.

Du J, 2015. Effect of Volatile in Migratory between Peach Trees and Pear Trees and Management Threshold of Oriental Fruit Moth. PhD Dissertation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [杜娟, 2015. 梨小食心虫在桃、梨之间转移危害的挥发物诱导与防治指标研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文]

Du J, Wang YR, Wu JX, 2010. Effect of four different artificial diets on development and reproduction of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Shanxi Agric. Univ.*, 30(3): 228-231. [杜娟, 王艳蓉, 仵均祥, 2010. 不同饲料配方对梨小食心虫生长发育及繁殖的影响. 山西农业大学学报, 30(3): 228-231]

Field FM, Picket JA, Wadhams LJ, 2000. Molecular studies in insect olfaction. *Insect Mol. Biol.*, 9(6): 545-551.

Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2009. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10: 332.

Grosse-Wilde E, Kuebler LS, Bucks S, Vogel H, Wicher D, Hansson BS, 2011. Antennal transcriptome of *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(18): 7449-7454.

Gu SH, Wu KM, Guo YY, Pickett JA, Field LM, Zhou JJ, Zhang YJ, 2013. Identification of genes expressed in the sex pheromone gland of the black cutworm *Agrotis ipsilon* with putative roles in sex pheromone biosynthesis and transport. *BMC Genomics*, 14: 636.

Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA, 2002. Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 12(9): 1357-1369.

Hu P, Tao J, Cui MM, Gao CL, Lu PF, Luo YQ, 2016. Antennal transcriptome analysis and expression profiles of odorant binding proteins in *Eogystia hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae). *BMC Genomics*, 17: 651.

Hua JF, Zhang S, Cui JJ, Wang DJ, Wang CY, Luo JY, Lv LM, 2012. Identification and binding characterization of three odorant binding proteins and one chemosensory protein from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur). *J. Chem. Ecol.*, 38(9): 1163-1170.

Il'ichev AL, Kugimiya S, Williams DG, Takabayashi J, 2009. Volatile compounds from young peach shoots attract males of oriental fruit moth in the field. *J. Plant Interact.*, 4(4): 289-294.

Knight AL, Hilton R, Light DM, 2005. Monitoring codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple with blends of ethyl (*E*,*Z*)-2,4-decadienoate and codlemone. *Environ. Entomol.*, 34(3): 598-603.

Li GW, 2016. Molecular Mechanisms of Recognition of Host Plant Volatiles in *Grapholita molesta* Busck. PhD Dissertation, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [李广伟, 2016. 梨小食心虫识别寄主植物挥发物的分子机制. 陕西杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文]

Li GW, Chen XL, Li BL, Zhang GH, Li YP, Wu JX, 2016a. Binding properties of general odorant binding proteins from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *PLoS ONE*, 11(5): e0155096.

Li GW, Du J, Li YP, Wu JX, 2015. Identification of putative olfactory genes from the oriental fruit moth *Grapholita molesta* via an antennal transcriptome analysis. *PLoS ONE*, 10(11): e0142193.

Li GW, Zhang Y, Li YP, Wu JX, Xu XL, 2016b. Cloning, expression, and functional analysis of three odorant binding proteins of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 91(2): 67-87.

Li S, Picimbon JF, Ji S, Kan Y, Qiao C, Zhou JJ, Pelosi P, 2008. Multiple functions of an odorant-binding protein in the mosquito *Aedes aegypti*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372(3): 464-468.

Li ZQ, He P, Zhang YN, Dong SL, 2017. Molecular and functional characterization of three odorant-binding protein from *Periplaneta americana*. *PLoS ONE*, 12(1): e0170072.

Li ZQ, Zhang S, Luo JY, Cui JJ, Ma Y, Dong SL, 2013. Two Minus-C odorant binding proteins from *Helicoverpa armigera* display higher ligand binding affinity at acidic pH than neutral pH. *J. Insect*

Physiol., 59(3): 263-272.

Liu Y, Gu SH, Zhang Y, Guo Y, Wang G, 2012. Candidate olfaction genes identified within the *Helicoverpa armigera* antennal transcriptome. *PLoS ONE*, 7(10): e48260.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402-408.

Lu PF, Huang LQ, Wang CZ, 2010. Semiochemicals used in chemical communication in the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomol. Sin*., 53(12): 1390-1403.［陆鹏飞，黄玲巧，王琛柱，2010. 梨小食心虫化学通信中的信息物质. 昆虫学报，53(12): 1390-1403］

Natale D, Mattiacci L, Pasqualini E, Dorn S, 2004. Apple and peach fruit volatiles and the apple constituent butyl hexanoate attract female oriental fruit moth, *Cydia molesta*, in the laboratory. *J. Appl. Entomol*., 128(1): 22-27.

Nishida R, Baker TC, Roelofs WL, 1982. Hairpencil pheromone components of male oriental fruit moths, *Grapholitha molesta*. *J. Chem. Ecol*., 8(6): 947-959.

Niu DJ, Liu Y, Dong XT, Dong SL, 2016. Transcriptome based identification and tissue expression profiles of chemosensory genes in *Blattella germanica* (Blattaria: Blattidae). *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom*., 18: 30-43.

Pasqualini E, Schmidt S, Espinha I, Civolani S, Cristofaro AD, Molinari F, Villa M, Ladurner E, Sauphanor B, Ioriatti C, 2005. Effects of the kairomone ethyl (2*E*,4*Z*)-2,4-decadienoate (DA2313) on the oviposition behavior of *Cydia pomonella*: preliminary investigations. *Bull. Insectol*., 58(2): 119-124.

Pelletier J, Guidolin A, Syed Z, Cornel AJ, Leal WS, 2010. Knockdown of a mosquito odorant-binding protein involved in the sensitive detection of oviposition attractants. *J. Chem. Ecol*., 36(3): 245-248.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci*., 63(14): 1658-1676.

Qiao H, He X, Schymura D, Ban L, Field L, Dani FR, Michelucci E, Caputo B, Della TA, Iatrou K, Zhou JJ, Krieger J, Pelosi P, 2011. Cooperative interactions between odorant-binding proteins of *Anopheles gambiae*. *Cell. Mol. Life Sci*., 68(10): 1799-1813.

Rebijith KB, Asokan R, Hande RH, Krishna Kumar NK, Krishna V, Vinutha J, Bakthavatsalam N, 2016. RNA interference of odorant-binding protein 2 (OBP2) of the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Glover), resulted in altered electrophysiological responses. *Appl. Biochem. Biotech*., 178(2): 251-266.

Sheng S, Liao CW, Zheng Y, Zhou Y, Xu Yan, Song WM, He P, Zhang J, Wu FA, 2017. Candidate chemosensory genes identified in the endoparasitoid *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae) by antennal transcriptome analysis. *Comp. Biochem. Physiol. D Genom. Proteom*., 22: 20-31.

Song YQ, Dong JF, Qiao HL, Wu JX, 2014. Molecular characterization, expression patterns and binding properties of two pheromone-binding proteins from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck). *J. Integr. Agric*., 13(12): 2709-2720.

Song YQ, Xie XC, Dong JF, Wu JX, 2014. cDNA cloning, expression profiling and binding properties of odorant-binding protein GmolOBP3 in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptara: Tortricidae). *Acta Entomol. Sin*., 57(3): 274-285.［宋月芹，解幸承，董钧锋，仵均祥，2014. 梨小食心虫气味结合蛋白 GmolOBP3 的 cDNA 克隆表达谱及结合特性分析. 昆虫学报，57(3): 274-285］

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol*., 28(10): 2731-2739.

Tian CP, Wei JL, Liu XJ, Wang N, Wang HB, Sun JZ, Li DT, Chen XS, 2009. GC-MS analysis of fruit aromatic components of pear cultivars originates from different species of *Pyrus*. *J. Fruit Sci*., 26(3): 294-299.［田长平，魏景利，刘晓静，王娜，王海波，孙家正，李登涛，陈学森，2009. 梨不同品种果实香气成分的 GC-MS 分析. 果树学报，26(3): 294-299］

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161-163.

Wang B, Liu Y, Wang GR, 2017. Chemosensory genes in the antennal transcriptome of two syrphid species, *Episyrphus balteatus* and *Eupeodes corollae* (Diptera: Syrphidae). *BMC Genomics*, 18(1): 586.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2004. Research advance on molecular mechanism of odors perception in insects. *J. Agric. Biotechnol*., 12(6): 720-726.［王桂荣，吴孔明，郭予元，2004. 昆虫感受气味物质的分子机制研究进展. 农业生物科技学报，12(6): 720-726］

Wei D, Ye ZF, Gao JQ, Dong SL, 2013. Molecular cloning and functional identification of a Minus-C odorant binding protein from the rice striped stem borer, (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomol. Sin*., 56(7): 754-764.［魏丹，叶占峰，高建清，董双林，2013. 二化螟 Minus-C 气味结合蛋白的分子克隆及功能鉴定. 昆虫学报，56(7): 754-764］

Yang ZH, Bengtsson M, Witzgall P, 2004. Host plant volatiles synergize response to sex pheromone in codling moth, *Cydia pomonella*. *J. Chem. Ecol*., 30(3): 619-629.

Zhang GH, Li YP, Xu XL, Chen H, Wu JX, 2012. Identification and characterization of two general odorant binding protein genes from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck). *J. Chem. Ecol*., 38(4): 427-436.

Zhang TT, Gu SH, Wu KM, Zhang YJ, Guo YY, 2011. Construction and analysis of cDNA libraries from the antennae of male and female cotton bollworms *Helicoverpa armigera* (Hübner) and expression analysis of putative odorant-binding protein genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 407(2): 393-399.

Zhang TT, Mei XD, Feng JN, Berg BG, Zhang YJ, Guo YY, 2012. Characterization of three pheromone-binding proteins (PBPs) of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and their binding properties. *J. Insect Physiol*., 58(7): 941-948.

Zhang XY, Zhu XQ, Gu SH, Zhou YL, Wang SY, Zhang YJ, Guo YY, 2017. Silencing of odorant binding protein gene *AlinOBP*4 by RNAi induces declining electrophysiological responses of *Adelphocoris lineolatus* to six semiochemicals. *Insect Sci*., 24(5): 789-797.

Zhu GH, Xu J, Cui Z, Dong XT, Ye ZF, Niu DJ, Huang YP, Dong SL, 2016. Functional characterization of *SlitPBP*3 in *Spodoptera litura* by CRISPR/Cas9 mediated genome editing. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 75(5): 1-9.

（责任编辑：马丽萍）